



bmb+f - Förderschwerpunkt

Kondensierte Materie

Großgeräte der physikalischen
Grundlagenforschung

Schlussbericht vom 04.08.2004 zum Thema:

Konformationen von Motorproteinen

Zuwendungsempfänger:	MPG-AG für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg
Projektleitung:	Prof. Dr. E. Mandelkow
Förderkennzeichen:	05KS1EAB/8
Förderzeitraum:	01.04.2001 – 31.03.2004
Zuwendung:	161.046,00 EUR
E-Mail:	mandelkow@mpasmb.desy.de
Projektträger:	Projektträger DESY-HS

Genutzte Großgeräte:

DESY - DORIS

Angaben zum Projekt:

Veröffentlichungen:	9
Konferenzbeiträge:	12
Diplomarbeiten:	0
Dissertationen:	0
Habilitationen:	0
Patente:	0

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Schlussbericht-Kurzfassung

Zuwendungsempfänger: ***MPG-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie***

Projektleitung: ***Prof. Dr. Eckhard Mandelkow***

Konformationen von Motorproteinen

Das Ziel des Projekts war die Strukturanalyse von Motorproteinen der Kinesin-Klasse mit Hilfe von Proteinkristallographie und Synchrotronstrahlung, sowie die Analyse der Konformationen, die die Umwandlung von chemischer Energie in Bewegung im molekularen Massstab vermitteln. Weitere wesentliche Aspekte waren die Struktur und Wechselwirkung zwischen Kinesin und Mikrotubuli, die die Gleise für den Transport in Zellen darstellen, sowie die Regulation durch andere Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs). Im Rahmen des Projekts wurden verschiedene Domänen und Varianten von Motorproteinen kloniert, bakteriell exprimiert, und strukturell untersucht. Die Ergebnisse aus unterschiedlichen experimentellen Ansätzen wurden in Form eines Bewegungsmodells visualisiert (vgl.

www.mpasmb-hamburg.mpg.de).

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: ***MPG-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie***

Projektleitung: ***Prof. Dr. Eckhard Mandelkow***

Konformationen von Motorproteinen

Das Ziel des Projekts ist die Analyse von Struktur und Funktion von Motorproteinen mit Hilfe von Röntgenmethoden und komplementären biophysikalischen Methoden. Motorproteine sind Enzyme, die chemische Energie (in Form von Adenosintriphosphat) verbrauchen und dadurch mechanische Energie erzeugen, um Bewegungsvorgänge in der Zelle zu ermöglichen. Beispiele sind das Schlagen von Geißeln und Zilien, die Kontraktion von Muskelzellen, die Trennung von Chromosomen bei der Zellteilung, oder der Transport von Zellorganellen innerhalb von Zellen. Es gibt zahlreiche Motorproteine mit unterschiedlicher Sequenz, Zusammensetzung aus funktionellen Domänen, Verteilung im Organismus, oder Wechselwirkung mit Partner-Molekülen. Sie lassen sich aufgrund ihrer "Motordomäne" in drei Klassen unterteilen, die Myosine, die Dyneine, und die Kinesine. Die Myosine bewegen sich entlang von Aktin-Filamenten, die Dyneine und Kinesine entlang von Mikrotubuli. Die Filamentsysteme erfüllen die Funktion von "Gleisen", die die Bewegungsrichtung in der Zelle vorgeben. Um die Funktion von Motorproteinen zu verstehen, muss man die Strukturen der Proteine analysieren, die Veränderungen der Struktur in Abhängigkeit vom Energieverbrauch (ATP-Hydrolyse) und von der Wechselwirkung mit dem Filamentsystem, sowie die Beladung und Entladung der zu transportierenden "Lasten" (Chromosomen, Mitochondrien usw). Mögliche Anwendungen dieser Forschung liegen im Bereich der Medizin (Entwicklung von neuartigen Zytostatika, die auf der Hemmung von mitotischen Motorproteinen beruhen) und im Bereich der Nanotechnologie (Entwicklung von molekularen Schaltern oder Motoren) (vgl. Mandelkow & Mandelkow, 2002). Der Schwerpunkt des vorliegenden Projekts lag auf der Identifikation von neuen Motorproteinen des Typs Kinesin, die sich in der Zelle entlang von Mikrotubuli bewegen, und ihrer Struktur- und Konformationsanalyse. Von besonderem Interesse war insbesondere die strukturelle Basis der Wechselwirkung zwischen Kinesin und Mikrotubuli und ihre Abhängigkeit von anderen Mikrotubuli-bindenden Proteinen.

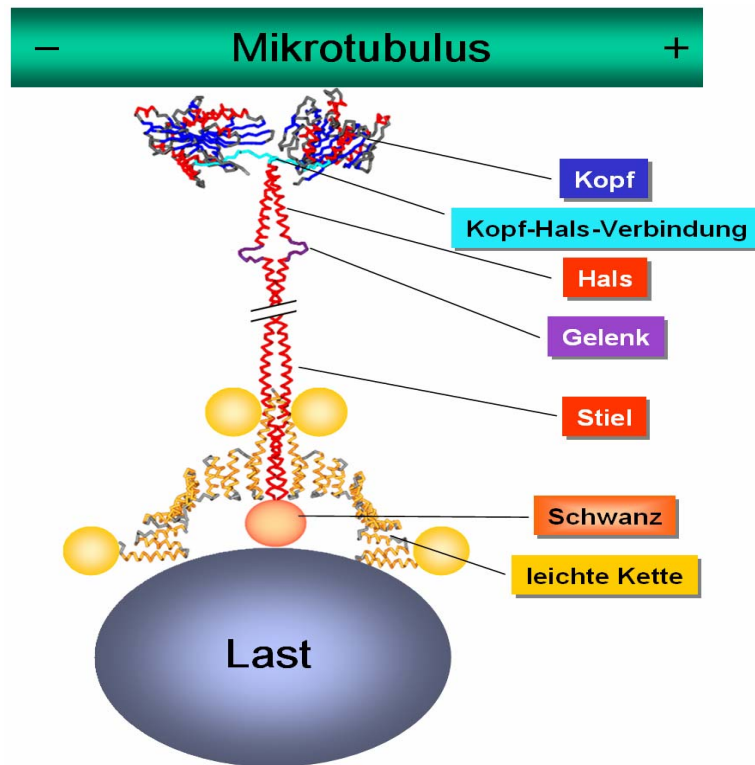


Abbildung 1

Schematische Darstellung des Transportkomplexes aus Mikrotubulus, konventionellem Kinesin und zu bewegendem Zellbestandteil

Das "konventionelle" Kinesin, der Hauptvertreter der Kinesine, liegt in der Regel als Heterotetramer, bestehend aus zwei schweren (KHC) und zwei leichten Peptidketten (KLC), vor. Abbildung 1 zeigt den gesamten Transportkomplex mit Mikrotubulus, Kinesin und der zu bewegendem Last in schematischer Darstellung. Jede der beiden schweren Ketten enthält eine etwa 350 Aminosäuren umfassende, globuläre Domäne. Die beiden Domänen sind sowohl für die Wechselwirkung mit dem Mikrotubulus, als auch für die Umwandlung chemischer Energie (in Form energiereicher ATP-Moleküle) in gerichtete Bewegung verantwortlich. Sie werden daher als Motordomänen oder auch als "Köpfe" bezeichnet. Die beiden Köpfe sind über zwei kurze, flexible Bereiche (hellblau) mit dem überwiegend α -helikalen Mittelteil (rot) verbunden. Der erste Teil dieses Bereiches wird als Hals bezeichnet. Anhand verschieden langer KHC-Konstrukte hat sich gezeigt, dass der Hals für die Dimerisierung der beiden schweren Ketten ausreicht (Kozielski et al., 1997). Konstrukte ohne Halsdomäne oder mit unvollständigem Hals liegen in Lösung als Monomer vor (Sack et al., 1997). Zwischen dem Hals und dem Rest des α -helikalen Mittelteils (Stiel), sowie innerhalb des Stiels gibt es mehrere flexible Bereiche. Sie

dienen als Gelenke und geben dem Molekül die für die Bewegung erforderliche Beweglichkeit. Außerdem ermöglichen sie im Ruhezustand das Zurückfalten des Schwanzendes zum Kopf, was zur Inaktivierung des Motors führt. Da über die Struktur der Schwanzdomäne nichts bekannt ist, ist sie in Abbildung 1 als Kugel (orange) dargestellt.

Die leichten Ketten binden am Schwanzende und dem unmittelbar vorausgehenden Teil des α -helikalen Bereiches der schweren Ketten. Sie sind vermutlich wesentlich an der Bindung der zu transportierenden Objekte beteiligt. Die Struktur der leichten Ketten ist noch nicht im Einzelnen bekannt. Sie enthalten je sechs Tetratricopeptide (jeweils 34 Aminosäuren in Form zweier antiparalleler α -Helizes), die sich zudem mit zwei DnaJ-Motiven überlappen. Diese Strukturmodule sind typischerweise an der Wechselwirkung mit Chaperon-Molekülen wie Hsp70 beteiligt.

In den Arbeiten Song et al. (2001) und Song et al. (2002) wurde die Struktur eines Kinesins aus dem Organismus *Neurospora crassa* analysiert, das sich durch eine besonders hohe Geschwindigkeit auszeichnet (vgl. verschiedene Arbeiten von M. Schliwa, G. Woehlke und Mitarbeitern an der Universität München, mit denen eine Zusammenarbeit bestand). Aufgrund seiner Sequenzhomologie wird es zur Klasse der konventionellen Kinesine gerechnet, obwohl bisher keine leichten Ketten gefunden wurden. Gegenüber den Kinesinen, die wir in früheren Publikationen beschrieben hatten (Sack et al., 1997; Kozielski et al., 1997), weist das *Neurospora*-Kinesin mehrere strukturelle Veränderungen auf. Ein für die Koordinierung von Nukleotidzustand und Bindung an den Mikrotubulus essentieller Bereich (L11), der in den meisten bekannten Strukturen ungeordnet und deshalb unsichtbar ist, nimmt in der Struktur des monomeren *Neurospora*-Kinesins eine eindeutige Konformation ein. Dies erlaubt die Beschreibung der vollständigen Nukleotidbindungstasche mit insgesamt drei Salzbrücken zwischen den so genannten Schalter-Regionen (Sw1 und Sw2). Ein variabler Bereich (L9) in der ersten Schalter-Region erscheint im Vergleich zu den bisher untersuchten konventionellen Kinesinen nach außen gebogen, so dass die Nukleotidbindungstasche leichter zugänglich ist. Diese Verschiebung ähnelt der Konformationsänderung, die im G-Protein Ras beobachtet wird, wenn es mit seinem Nukleotid-Austauschfaktor komplexiert ist. Da der Austausch des Hydrolyse-Produkts ADP durch ATP der